

文章编号:1674-7054(2010)01-0090-05

橡胶树胶乳中橡胶粒子凝集相关蛋白研究进展

徐晓梅^{1,2}, 史敏晶¹, 吴继林¹, 郝秉中¹, 田维敏¹

(1. 中国热带农业科学院 橡胶研究所, 农业部橡胶树生物学重点开放实验室,

省部共建国家重点实验室培育基地——海南省热带作物栽培生理学重点实验室, 海南 儋州 571737;

2. 海南大学 农学院, 海南 儋州 571737)

摘 要: 排胶时间是限制天然橡胶产量的关键因子之一, 而乳管伤口堵塞物的形成决定着排胶时间的长短。橡胶粒子凝集与乳管伤口堵塞物的形成密切相关, 其凝集过程主要受胶乳中的蛋白质调节。笔者综述橡胶粒子凝集相关蛋白的研究进展, 旨在为橡胶树乳管堵塞机理的研究及排胶相关分子标记的研发提供参考资料。

关键词: 巴西橡胶树; 橡胶粒子凝集; 黄色体; 橡胶粒子; C-乳清

中图分类号: S 794.1

文献标志码: A

自然界有近 1 000 种植物能产生天然橡胶, 但是, 全球所需天然橡胶的绝大部分来自巴西橡胶树 (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.)^[1]。人们通过周期性切割橡胶树树干树皮 (即割胶) 获取贮存在乳管细胞中的胶乳。胶乳是乳管细胞的细胞质, 经超速离心后分为 3 层, 上层为橡胶粒子, 中层为 C-乳清, 下层为黄色体^[2]。胶乳经过凝固和加工, 制成天然橡胶。在排胶过程中, 被切割的乳管在其伤口末端形成堵塞物而阻止胶乳的流出, 这既是橡胶树的一种自我保护机制, 也是限制天然橡胶产量的关键因素^[2]。因此, 关于乳管伤口堵塞物形成及其调节机制是一个倍受关注的, 在天然橡胶生产中面临的重大理论问题^[3]。Southorn (1968) 借助电子显微镜在停止排胶的乳管伤口处观察到凝固的橡胶粒子和破裂的黄色体, 认为乳管伤口的堵塞是胶乳凝固 (形成橡胶凝块) 的结果, 在本质上与胶乳的体外凝固相同^[4]。人们普遍接受了这种观点, 并利用胶乳体外凝固实验系统开展乳管堵塞机理的研究, 提出了各种假说, 如“电中和”假说^[4]、“酶”假说^[5-6]和“凝集素”假说^[7-8]。其中, 比较有说服力的是“凝集素”假说。根据“凝集素”假说, 橡胶凝块的形成分为 2 个阶段, 首先是橡胶粒子凝集, 然后是凝集的橡胶粒子破裂形成橡胶凝块^[7]。为此, 人们开展了从胶乳中分离鉴定与橡胶粒子凝集相关蛋白质的研究。笔者对这方面的研究进展进行了综述, 旨在为橡胶树乳管堵塞机理的研究及排胶相关分子标记的研发提供参考资料。

1 黄色体中橡胶粒子凝集相关蛋白

黄色体是乳管细胞特有的细胞器, 本质上是一种分散性液泡-溶酶体小泡, 直径通常在 0.5~3 μm 之间, 包被 1 层厚约 8 nm 的单位膜^[9-10]。新鲜胶乳高速离心后, 黄色体存在于底层的灰黄色沉淀部分, 占胶乳鲜质量的 15%~30%, 占胶乳体积的 10%~20%^[11]。黄色体对渗透压很敏感, 在低渗条件下容易破裂。冻融的黄色体经高速离心后的上清液称为 B-乳清, 其中含有大量可溶性蛋白质。黄色体与胶乳凝固密切相关^[12-13]。

1.1 B-乳清中橡胶粒子凝集相关蛋白 B-乳清中有 3 种主要的蛋白质, 即橡胶素、几丁质酶和 β-1, 3-葡聚糖酶。橡胶素和几丁质酶被证明与橡胶粒子凝集有关^[7]。

收稿日期: 2009-06-03

基金项目: 国家自然科学基金 (30671712); 现代农业产业技术体系建设专项资金 (nycytx-34-GW1-2)

作者简介: 徐晓梅 (1984-), 女, 山东单县人, 海南大学农学院 2007 级硕士研究生。

通信作者: 田维敏 (1965-), 男, 博士, 教授, 博士生导师。研究方向: 植物发育生物学。E-mail: wmtian@163.com

橡胶素占B-乳清蛋白质的70%左右^[3],是一种由43个氨基酸组成的单链蛋白,富含半胱氨酸和甘氨酸,分子质量4.7 kDa^[14]。Broekaert等(1990)克隆了编码20 kDa橡胶素前体的cDNA,该橡胶素前体的N端区域与麦胚凝集素和几种几丁质结合蛋白同源^[15]。在黄色体中,20 kDa橡胶素前体被加工成橡胶素(即橡胶素前体的N端区域)和14 kDa蛋白(即橡胶素前体的C-端结构域)2种蛋白质。橡胶素是一种几丁质结合蛋白^[15-16],而14 kDa蛋白与橡胶素前体进入黄色体有关。橡胶素是一种典型的凝集素,在Ca²⁺存在的条件下,它与橡胶粒子膜上的一种22 kDa糖蛋白的N-乙酰-葡萄糖胺结合,促进橡胶粒子凝集^[7]。

几丁质酶占B-乳清蛋白质的20%左右,有7种同工酶,其中,1种为酸性几丁质酶,6种为碱性几丁质酶(即橡胶胺)^[17]。几丁质酶水解N-乙酰-葡萄糖胺分子间的 β -1,4-糖苷键。用几丁质酶处理橡胶粒子可除去22 kDa糖蛋白的N-乙酰-葡萄糖胺分子,同时抑制由橡胶素介导的橡胶粒子凝集^[7]。橡胶树在受乙烯利(一种天然橡胶产量刺激剂)刺激后排胶时间延长,此时,胶乳中几丁质酶基因上调表达,22 kDa蛋白质的N-乙酰-葡萄糖胺显著减少^[7],说明在乳管细胞中几丁质酶也是橡胶粒子去凝集的重要因子。

1.2 黄色体膜上橡胶粒子凝集相关蛋白 新鲜胶乳超速离心后分为3层:上层为橡胶相,中层为C-乳清,下层为黄色体(占优势的沉淀)。如果胶乳在室温放置2 h再超速离心,只出现2层:上层的橡胶相和下层的C-乳清,而原来的底层黄色体组分完全消失^[18]。很显然,消失的黄色体组分一部分进入C-乳清,另一部分进入橡胶相。最近,泰国学者 Wititsuwannakul 等人(2008)从黄色体膜上分离到一种与几丁质有高亲和性的凝集素蛋白,称之为HLL(*Hevea latex lectin-like*)蛋白,能凝集兔红细胞^[19]。天然HLL蛋白的分子质量276 kDa,但在SDS-PAGE条件下,分子质量为17 kDa,说明HLL是一个由16个17 kDa蛋白亚基组成的同源多聚体,该蛋白对兔红细胞的凝集活性是橡胶树树皮凝集素的16倍^[19-20]。他们发明了1种基于染料结合法的检测橡胶粒子体外凝集的技术,证明HLL蛋白专一性凝集橡胶粒子^[19]。

2 橡胶粒子膜上橡胶粒子凝集相关蛋白

橡胶粒子的膜是半个单位膜^[21]。根据其大小,橡胶粒子分为大橡胶粒子(直径一般大于0.4 μm)和小橡胶粒子(直径一般小于0.35 μm)2种,其中,95%的橡胶粒子是小橡胶粒子。在橡胶粒子的膜上有一种高含量的24 kDa蛋白质,称之为小橡胶粒子膜蛋白^[22]或Hev b3胶乳过敏原蛋白^[23-24]。最近,Wititsuwannakul等对这种蛋白质的生物化学性质及其在橡胶粒子凝集中的作用进行了深入研究^[25]。24 kDa蛋白质能结合黄色体膜上的17 kDa蛋白质(HLL),称之为RP-HLLBP(rubber particle-HLL binding protein)。RP-HLLBP对HLL蛋白介导的兔红细胞凝集有很高的抑制活性。天然的RP-HLLBP主要以同源五聚体,少量以同源六聚体的形式存在,并且在等电聚焦条件下,也分为1条主带(pI 5.2)和1条次带(pI 6.0)^[25]。在用Triton X-100提取的橡胶粒子膜蛋白中,只有RP-HLLBP是糖基化的,含有4.25%的中性糖,几丁质酶处理使其完全丧失对HLL介导的兔红细胞凝集的抑制活性,表明RP-HLLBP蛋白的糖基侧链含有N-乙酰-葡萄糖胺残基^[25],也说明它与Gidrol等报道的22 kDa蛋白质^[7]是同一种蛋白质。

3 C-乳清中橡胶粒子凝集相关蛋白

最近,在C-乳清中分离到一种能与黄色体膜上的橡胶凝集素(HLL)结合的蛋白质,称之为CS-HLLBP(C-serum HLL binding protein)^[8]。纯化的CS-HLLBP在SDS-PAGE条件下,分子质量为40 kDa,在凝胶过滤条件下,分子质量为204 kDa,说明天然的CS-HLLBP是以同源多聚体的形式存在的。CS-HLLBP是一种酸性蛋白,等电点为4.7,与报道的C-乳清中的一种 α -球蛋白相似^[26]。这种 α -球蛋白容易吸附在橡胶粒子表面,推测与维持橡胶粒子的胶体稳定性和防止胶乳凝固有关。CS-HLLBP与黄色体膜上的HLL蛋白的亲合力是RP-HLLBP的6倍,因此,它通过与橡胶粒子膜上的RP-HLLBP竞争结合黄色体膜上的同一位点(HLL)而抑制橡胶粒子凝集。几丁质酶处理的CS-HLLBP完全丧失这种抑制活性。CS-HLLBP的活性与每割次的胶乳产量和干胶含量都显著正相关^[8],有可能作为筛选高产(或排胶能力强)的橡胶树无性系或野生橡胶树种质的一个分子参数,辅助橡胶树的杂交育种。

4 橡胶粒子凝集相关蛋白对橡胶粒子凝集的作用机理

目前,从橡胶树的胶乳中只鉴定了上述 4 种与橡胶粒子凝集相关的蛋白质。关于这些蛋白质对橡胶粒子凝集的作用机理有 2 种观点。法国学者 Gidrol 等人^[7]认为,黄色体破裂后将 Ca^{2+} 、橡胶素和几丁质酶释放到 C-乳清中,在 Ca^{2+} 存在的条件下,橡胶素与悬浮在 C-乳清中的橡胶粒子的 22 kDa 膜蛋白(即小橡胶粒子膜蛋白)的 N-乙酰葡萄糖胺结合,使橡胶粒子交联在一起,导致橡胶粒子凝集。几丁质酶通过水解 N-乙酰葡萄糖胺之间的 $\beta-1,4$ -糖苷键,使 22 kDa 蛋白脱糖基化,从而解除橡胶粒子之间的交联,维持胶乳胶体性质的稳定性(图 1)。

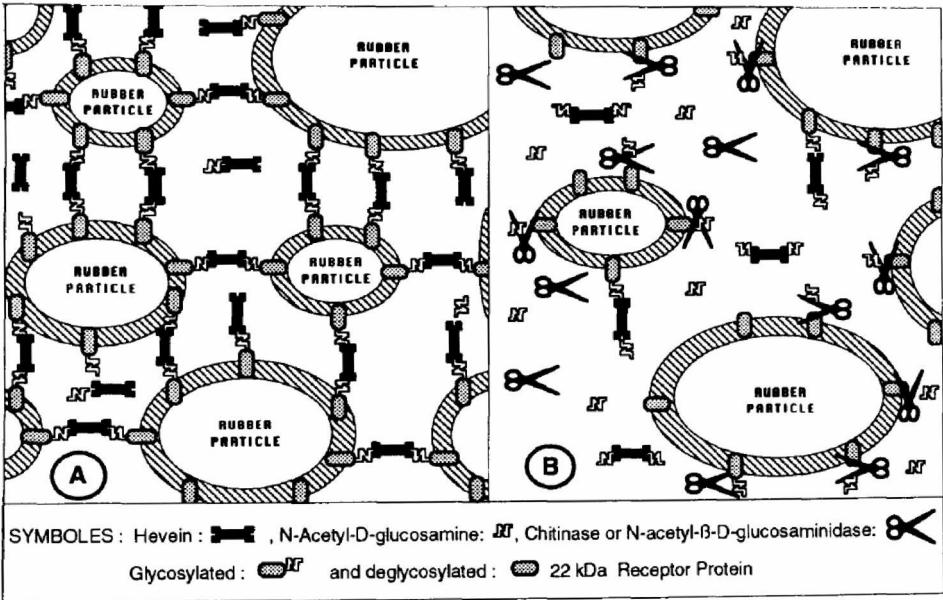


图 1 橡胶素和几丁质酶调节橡胶粒子凝集的模式^[7]

泰国学者 Wititsuwannakul 等^[8]认为橡胶素分子太小,靠其凝集的橡胶粒子不容易形成大的橡胶凝块复合物。此外,促进橡胶粒子凝集的 24 kDa 蛋白质(即 RP-HLLBP)和抑制橡胶粒子凝集的 CS-HLLBP 在几丁质酶处理后都完全丧失活性。因此,他们提出了另一个观点解释橡胶粒子的凝集机理(图 2):黄色体膜破裂后,暴露其膜内测的 HLL 蛋白位点,橡胶粒子膜上的一种 24 kDa 蛋白质通过与 HLL 蛋白结合而聚集在黄色体膜碎片上,导致橡胶粒子凝集。在黄色体膜上凝集的橡胶粒子容易形成较大的橡胶凝块复合物,有利于堵塞乳管伤口。另一方面,在 C-乳清中的 CS-HLLBP 通过与小橡胶粒子的 24 kDa 膜蛋白竞争结合黄色体膜上的同一位点(HLL)而抑制橡胶粒子凝集。

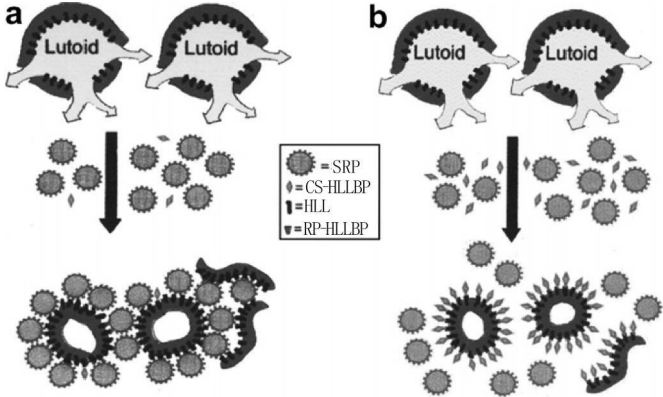


图 2 黄色体膜和 C-乳清蛋白调节橡胶粒子凝集的模式^[8]

5 结语与展望

以往体外检测橡胶粒子凝集都采用比色法,即在 600 nm 波长下测定反应体系在不同时间段的 OD

值^[7]。这种方法检测的结果不稳定,而且也没有形成完善的操作流程^[19]。所以,在 1994 年后的 10 多年时间里,仅从橡胶树的胶乳中鉴定了 2 种与橡胶粒子凝集相关的蛋白质(橡胶素和几丁质酶)。2008 年, Wititsuwannakul 等人发明了一种基于染料结合法的体外检测橡胶粒子凝集的技术^[19],并从黄色体膜上和 C-乳清中分别鉴定了 1 种促进橡胶粒子凝集的蛋白质(HLL)和 1 种抑制橡胶粒子凝集的蛋白质(CS-HLLBP),说明在胶乳中可能还存在未被鉴定的与橡胶粒子凝集相关的蛋白质。从胶乳中分离鉴定与橡胶粒子凝集相关蛋白质的意义在于:(1)揭示乳管伤口堵塞物形成和调节机制,为开发新型的排胶促进剂提供理论基础。自 19 世纪 70 年代初发现乙烯利刺激显著增加天然橡胶产量以来,在天然橡胶生产中一直使用这种单一的刺激剂。乙烯利的应用一方面大幅度提高了世界天然橡胶的产量,另一方面也给天然橡胶生产带来了日益明显的负面效应,如橡胶树死皮和树皮衰老等。因此,新型刺激剂的研发已刻不容缓;(2)开发与产量或排胶能力相关的分子标记,辅助橡胶树的杂交育种。例如,C-乳清中的 CS-HLLBP 的活性与每割次的胶乳产量和干胶含量显著正相关^[8],有可能作为筛选高产或排胶能力强的橡胶树无性系或野生种质的一个分子标记。

郝秉中等人用电子显微镜观察了刚停止排胶的乳管伤口的超微结构,并在乳管伤口的堵塞物中发现一个蛋白质性质的网状结构(称之为“蛋白质网”)和由完整的橡胶粒子组成的聚集物,但没有观察到橡胶凝块^[27]。过去在乳管伤口堵塞物中只观察到橡胶凝块的主要原因是采样时间相对延后,不是在胶乳停排后马上采样^[3,13],这样就导致橡胶粒子破裂形成橡胶凝块。这一发现表明,乳管伤口堵塞机理与胶乳体外凝固机理在本质上是不同的。乳管伤口堵塞物中的蛋白质网的成分是什么?这些蛋白质之间是怎样相互交联的?蛋白质网与橡胶粒子和黄色体膜之间是怎样相互作用的?胶乳中是否还存在其他与橡胶粒子凝集相关的蛋白质等诸多问题的阐明,将有助于全面揭示乳管伤口封闭的生物化学机理。

参考文献:

- [1] YEANG H Y, ARIF S A M, YUSOF F, *et al.* Allergenic proteins of natural rubber latex[J]. *Methods*, 2002, 27:32-45.
- [2] HAO B Z, WU J L. Biology of laticifers in *Hevea* and latex production[J]. *热带作物学报*, 2004, 25(4):1-7.
- [3] D'AUZAC J, JACOB J L, CHRESTIN H. Physiology of rubber tree latex[M]. CRC Press, Inc. 1989:63-87.
- [4] SOUTHORN W A. Latex flow studies. I. Electron microscopy of *Hevea brasiliensis* in the region of the tapping cut[J]. *J Nat Rubb Res*, 1968, 20:176-186.
- [5] WOO C H. Rubber coagulation by enzymes of *Hevea brasiliensis* latex[J]. *J Nat Rubb Res*, 1973, 23(5):323-332.
- [6] WOO C H. "Coagulase" from the fraction of *Hevea latex*[J]. *J Nat Rubb Res*, 1976, 24(4):227-232.
- [7] GIDROL X, CHRESTEIN H, TAN H L, *et al.* Hevein, a lectin-like protein from *Hevea brasiliensis* (rubber tree) is involved in the coagulation of latex[J]. *J Biol Chem*, 1994, 269:9278-9283.
- [8] WITITSUWANNAKUL R, PASITKUL P, JEWTRAGOON P, *et al.* *Hevea latex lectin binding protein in C-serum as an antilatax coagulating factor and its role in a proposed new model for latex coagulation*[J]. *Phytochemistry*, 2008, 69:656-662.
- [9] DICKENSON P B. Electron microscopical studies of the latex vessel system of *Hevea brasiliensis*[J]. *J. Nat Rubb Res*, 1969, 2(4):543-559.
- [10] GOMEZ J B. Comparative ultracytology of young and mature latex vessels in *Hevea brasiliensis*[M]. in *Proc Int Rubber Conf*. 1975, Rubber Research Institute Malaysia, Kuala Lumpur, 1976:143-151.
- [11] D'AUZAC J, PRÉVÔT J C, JACOB J L. What's new about lutoids? A vacuolar system model from *Hevea latex*[J]. *Plant Physiol Biochem*, 1995, 33(6):765-777.
- [12] SOUTHORN W A, EDWIN E E. Latex flow studies. II. Influence of lutoids on the stability and flow *Hevea latex*[J]. *J Nat Rubb Res*, 1968, 20(4):187-201.
- [13] SOUTHORN W A. Physiology of *Hevea* (latex flow) [J]. *J Nat Rubb Res*, 1969, 21:494-512.
- [14] VAN PARIJS J, WILLEM F, GOLDSTEIN I J, *et al.* Hevein: an antifungal protein from rubber-tree (*Hevea brasiliensis*) latex[J]. *Planta*, 1991, 183:258-264.
- [15] BROKAERT W, LEE H I, CHUA N H, *et al.* Wound-induced accumulation of mRNA containing a hevein sequence in laticifers of rubber tree (*Hevea brasiliensis*) [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87(19):7633-7637.
- [16] BEINTEMA J J. Structural features of plant chitinases and chitin-binding proteins[J]. *FEBS Lett*, 1994, 350:159-163.
- [17] MARTIN M N. The latex of *Hevea brasiliensis* contains high levels of both chitinase and chitinase/lysozymes[J]. *Plant Physi-*

- ol, 1991, 95: 469 – 476.
- [18] WITITSUWAANAKUL D, RATTANAPITTAYAPORN A, KOYAMA T, *et al.* Involvement of *Hevea* latex organelle membrane proteins in the rubber biosynthesis activity and regulatory function[J]. *Macromol Biosci*, 2004, 4: 314 – 323.
- [19] WITITSUWANNAKUL R, PASITKUL P, KANOKWIROON K, *et al.* A role for a *Hevea* latex lectin-like protein in mediating rubber particle aggregation and latex coagulation[J]. *Phytochemistry*, 2008c, 69:339 – 347 .
- [20] WITITSUWANNAKUL R, WITITSUWANNAKUL D, SAKULBORIRUG C. A lactin from the bark of the rubber tree (*Hevea brasiliensis*) [J]. *Phytochemistry*, 1998,47:183 – 187.
- [21] COMISH K, WOOD D F, WINDLE J J. Rubber particles from four different species, examined by transmission electron microscopy and electron-paramagnetic-resonance spin labeling, are found to consist of a homogeneous rubber core enclosed by a contiguous, monolayer biomembrane[J]. *Planta*, 1999,210:85 – 96.
- [22] OH S K, KANG H, SHIN D H, *et al.* Isolation, characterization, and functional analysis of a novel cDNA clone encoding a small rubber particle protein from *Hevea brasiliensis*[J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(24): 17132 – 17138.
- [23] YEANG H Y, CHEONG K F, SUNDERASAN E, *et al.* The 14.6 kDa rubber elongation factor (Hev b1) and 24 kDa (Hev b3) rubber particle proteins are recognized by IgE from patients with spina bifida and latex allergy[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 1996, 98: 628 – 639.
- [24] YEANG H Y, WARD M A, ZAMRI A S, *et al.* Amino acid sequence similarity of Hevb3 to two previously reported 27 – and 23 – kDa latex proteins allergenic to spina bifida patients[J]. *Allergy*, 1998, 53: 513 – 519.
- [25] WITITSUWANNAKUL R, RUKSEREE K, KANOKWIROON K, *et al.* A rubber particle protein specific for *Hevea* latex lectin binding involved in latex coagulation[J]. *Phytochemistry*, 2008b, 69:1111 – 1118.
- [26] ARCHER B L, COCKBAIN E G. The proteins of *Hevea brasiliensis* latex 2. Isolation of the α -globulin of fresh latex serum [J]. *Biochem J*, 1995, 61: 508 – 512.
- [27] HAO B Z, WU J L, MENG C X, *et al.* Laticifer wound plugging in *Hevea brasiliensis*: The role of protein-network with rubber particle aggregations in stopping latex flow and protecting wounded laticifers[J]. *J Rubb Res*, 2004, 7(4):281 – 299.

Progresses of Isolation and Characterization of Proteins Related to Rubber Particle Aggregation in Latex of Rubber Tree (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.)

XU Xiao-mei^{1,2}, SHI Min-jing¹, WU Ji-lin¹, HAO Bing-zhong¹, TIAN Wei-min¹

(1. Key Laboratory of Rubber Biology of Ministry of Agriculture/State Key Laboratory Incubation Base for Cultivation and Physiology of Tropical Crops, Rubber Research Institute, CATAS, Danzhou 571737, China;

2. College of Agriculture, Hainan University, Danzhou 571737, China)

Abstract: Duration of latex flow after tapping is a crucial factor that limits rubber yield, which is mainly determined by the plugging formation at the end of severed laticifers. The protein in latex plays an important role in the regulation of rubber particle aggregation, which is closely associated with the plugging formation. In order to provide clues for elucidating the mechanism by which the severed laticifers are plugged and for exploring molecular markers applied in predicting the yield potential and ability of latex flow of clones or wild germplasms of rubber tree in *Hevea* breeding program, the progresses of the isolation and characterization of proteins related to rubber particle aggregation in latex were reviewed.

Key words: *Hevea brasiliensis* Muell. Arg.; rubber particle aggregation; luteoid; rubber particles; C-serum